

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP00/4848



ESU

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

REC'D 22 AUG 2000

WIPO PCT

**Aktenzeichen:** 199 25 810.4

**Anmeldetag:** 07. Juni 1999

**Anmelder/Inhaber:** PAZ Arzneimittel-Entwicklungsgesellschaft mbH,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Anwendung von Verapamil und Verapamilderivaten  
zur Herstellung von Arzneimitteln mit Glucuronidase  
hemmender Wirkung

**IPC:** A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 15. Juni 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Sailer

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Anwendung von Verapamil und Verapamilderivaten zur Herstellung von Arzneimitteln mit Glucuronidase hemmender Wirkung**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Anwendung von Glucuronidase-hemmern des Verapamil-Typs in Arzneimitteln zur Hemmung des Enzyms beta-Glucuronidase im menschlichen oder tierischen Organismus mit dem Ziel, therapeutische Effekte direkt zu erzielen oder durch kombinierte Anwendung zusammen mit anderen Wirkstoffen deren therapeutische Breite zu verbessern.

Die Konjugation von endogenen oder exogenen Stoffen mit Glucuronsäure ist eine wichtige Stoffwechselreaktion bei Mensch und Tier. Glucuronsäure kann mit den unterschiedlichsten Stoffen, z.B. Arzneimittelwirkstoffen und deren Metabolite konjugiert werden. Die Konjugationsreaktion erfolgt durch Übertragung von aktivierter Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) auf das Substrat mittels des Enzyms Glucuronyltransferase. Der Organismus bedient sich der Konjugationsreaktionen im allgemeinen zur Entgiftung, da Glucuronsäurekonjugate üblicherweise weniger toxisch sind und aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit leicht über die Nieren oder als Gallensekret über den Darm ausgeschieden werden. Eine Konjugation kann auch auf nichtenzymatischem Wege durch chemische Synthese erfolgen.

Die Glucuronsäurekonjugate können aber auch durch katalytische Wirkung von Glucuronidasen in Glucuronsäure und in das Ausgangsprodukt gespalten werden. Die Spaltung von Glucuroniden findet häufig nach Ausscheidung derselben über die Galle in tieferliegenden Dünndarmabschnitten oder im Dickdarm statt. Die dabei entstehenden Ausgangssubstanzen können wieder resorbiert und somit im Organismus erneut aktiv werden. Dieser als enterohepatischer Kreislauf bezeichnete Vorgang kann die erwünschte Wirkung von Substanzen verlängern, aber auch die toxischen Wirkungen giftiger Substanzen steigern.

Durch medikamentöse Regulierung der beta-Glucuronidase-Aktivität in den unterschiedlichen Geweben eröffnen sich neue Therapiekonzepte.

## **1 Unterbindung des enterohepatischen Kreislaufs von toxischen Substanzen**

Der enterohepatische Kreislauf kann zu einer Verzögerung der Entgiftung des Organismus führen. Dies kann besonders in Patienten mit renaler Insuffizienz problematisch werden. So ist z.B. bei Rheumapatienten mit renaler Insuffizienz nach längerer Einnahme von NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) mit klinisch relevanten Nebenwirkungen zu rechnen [Brater D. C., J Clin Pharmacol (1988) 28: 518-23].

Glucuronidasehemmer können den enterohepatischen Kreislauf unterbinden. Die Ausscheidung von Lorazepam läßt sich z.B. beim Menschen um ca. 25 % beschleunigen, wenn die Glucuronidaseaktivität im Darm durch die inhibitorische Wirkung von Neomycin oder Cholestyramin verringert wird und somit die Recyclisierung von Lorazepam über die Glucuronidspaltung unterbleibt [Herman R. J., Clin Pharmacol Ther (1989) 46: 18-25].

Auf analoge Weise wird die Wirkungsdauer von Phenobarbital oder Progesterone deutlich verkürzt. Dies konnte in Tierversuchen mit dem beta- Glucuronidasehemmer D-Glucarsäure-1,4-lacton gezeigt werden [Marselos M., Biochem Pharmacol (1975) 24: 1855-8, bzgl. D-Glucarsäure-1,4-lacton auf Polymerträgern siehe auch Sacco C., Hum Exp Toxicol (1994) 13:759-63]. Neben der Detoxifizierung können Glucuronidasehemmer auch unterstützend bei der Behandlung des Intestinal-Traktes eingesetzt werden.

## **2 Neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung des Intestinaltraktes**

Naturgemäß werden auch Arzneistoffe aus dem Dünn- bzw. Dickdarm in den Blutkreislauf resorbiert. Daher ist die medikamentöse Behandlung des Dünndarms und des Dickdarms oftmals nur eingeschränkt möglich, da durch die Resorption der Wirkstoffe die erkrankten Stellen oftmals nicht erreicht werden und/oder durch den resorbierten Wirkstoff systemisch unerwünschte Nebenwirkungen auftreten.

Einen neuen Therapieansatz ermöglichen Glucuronidkonjugate von Arzneiwirkstoffen, die im Magen-Darm-Trakt nicht resorbiert werden, aber lokal im Darm nach Spaltung durch beta-Glucuronidasen ihre Wirkung entfalten.

In diese Richtung zielen experimentelle Studien mit den Glucuroniden von Budesonid [Cui N., Gut (1994) 35: 1439-46] und Dexamethason [Haeberlin B., Pharm Res (1993) 10: 1553-62] ab.

Eine weitere Verbesserung der Therapie mit diesen Glucuronid-Produgs ist durch adjuvante Gabe von beta-Glucuronidasehemmern denkbar. Besonders die Behandlung tiefer liegender Darmabschnitte ließe sich dadurch verbessern. Die beta-Glucuronidasehemmern können eine vorzeitige Spaltung der Prodrugglucuronide bei der Passage des oberen Magen-Darm-Traktes verhindern. In den tieferliegenden Darmabschnitten erfolgt durch die bis dahin eingetretene Verdünnung bzw. Resorption des beta-Glucuronidaseinhibitors und die erhöhte beta-Glucuronidaseaktivität der lokalen Darmflora die Spaltung zum wirksamen Agens. Neben der Steuerung der gezielten Behandlung erkrankter Darmabschnitte eröffnen Glucuronidasehemmer vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten in der Krebstherapie.

### **3 Anwendung von Glucuronidase-Hemmern in der Krebstherapie**

Eine Besonderheit von Tumorgeweben ist ihre hohe Konzentration an beta-Glucuronidase bzw. eine extrem hohe Glucuronidaseaktivität. Eng assoziiert mit der erhöhten Glucuronidaseaktivität ist die Neigung bestimmter Tumore Metastasen zu bilden. Durch alleinige Gabe eines beta-Glucuronidasehemmers wird bei Tumoren, die aufgrund der erhöhten beta-Glucuronidaseaktivität zur Progression und Metastasenbildung neigen, die Tumorausbreitung über die Hemmung der Tumorglucuronidase reduziert. Saccharo-1,4-lacton, 2-Acetamidoglycal und Heparinderivate wurden zu diesem Zweck getestet [Bernacki R. J., Cancer Metastasis Rev (1985) 4: 81-101; Nakajima M., Journal of Cellular Biochemistry (1988) 36: 157-167; Niwa T., Journal of Biochemistry (1972) 72: 207-211]. Selektive Glucuronidaseinhibitoren sind in jüngster Zeit synthetisiert worden (Bosslet K., EP 0822192).

Neben dem alleinigen Einsatz zur Therapie können Glucuronidasehemmer auch unterstützend in der Chemotherapie von Krebspatienten zur Erhöhung des erwünschten Effektes bei gleichzeitiger Reduzierung der unerwünschten Wirkungen eingesetzt werden.

Die Chemotherapie bedingt eine außerordentliche physische und psychische Belastung des Krebspatienten. Glucuronidasehemmer können negative Auswirkungen der Chemotherapie mildern und gleichzeitig die Effektivität der Therapie steigern. Dafür bieten sich folgende Ansatzpunkte.

Chemotherapeutika werden unter anderem auch via ihrer Glucuronide über den Darm ausgeschieden. Durch die Wirkungen der dort vorhandenen Glucuronidasen erfolgt eine Spaltung dieser Glucuronide und Freisetzung der aktiven zelltoxischen Substanzen, die das in ständiger Zellteilung und Regeneration befindliche Darmgewebe schädigen. Daraus resultieren für den Patienten Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, verbunden mit einem Flüssigkeits- und Gewichtsverlust.

Beta-Glucuronidaseinhibitoren können den Darm vor toxischen Produkten aus Cytostatika-Glucuroniden schützen. So kann z.B. die intestinale Toxizität des Antitumormittels Irinotectan Hydrochlorid, durch präventive Gabe des beta-Glucuronidaseinhibitors Baicalin minimiert werden. Die Patienten werden so vor einer massiven Diarrhöe und dem damit verbundenen Flüssigkeitsverlust geschützt [Takasuna, K, Jpn J Cancer Res (1995) 86: 978-84; Kamataki T., US-Pat. 5,447,719).

Es bestehen Überlegungen, die Spaltung von Glucuroniden in bestimmten Geweben zu nutzen, um aus inaktiven Vorstufen von wirksamen Arzneimitteln (Prodrugs) die aktiven Substanzen freizusetzen. Durch die bevorzugte Freisetzung in erkrankten Zielgeweben kann über die erhöhte Substanzkonzentration eine mehr oder weniger lokale Wirkung bei geringer systemischer Wirkung erzielt werden [Sperker B., Clin Pharmacokinet (1997) 33: 18-31]. Diese Therapiemöglichkeit wäre vor allem bei der Anwendung nebenwirkungsreicher Substanzen in der Tumorthherapie von Interesse, weil die erwünschten cytotoxischen Eigen-

schaften von Chemotherapeutika auf das Tumorgewebe konzentriert werden können. Die Tumorprogression und die Metastasenbildung ist häufig mit einer erhöhten beta-Glucuronidaseaktivität verbunden. In nekrotischen Tumorbereichen liegt eine erhöhte Glucuronidaseaktivität im Extrazellulärraum vor, während im gesunden Gewebe die Glucuronidaseaktivität weitgehend intrazellulär lokalisiert ist. Ein im Tumor nach sauer verschobener pH-Wert kann die Aktivität der beta-Glucuronidase nochmals erhöhen. Diese physiologischen Bedingungen bieten Ansatzpunkte für die Applikation von Glucuronsäurekonjugaten mit Chemotherapeutika an Tumorpatienten zur lokalen Freisetzung der wirksamen Substrate nach Spaltung durch die lokal erhöhte Glucuronidaseaktivität [Sperker B., Clin Pharmacokinet (1997) 33: 18-31]. Verstärkt werden könnte die lokale Wirkung durch gleichzeitige Gabe einer Glucuronidprodrug und eines tumorspezifischen Antikörpers, der covalent mit beta-Glucuronidase verbunden ist (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy = ADEPT) [Sperker B., Clin Pharmacokinet (1997) 33: 18-31].

Die erhöhte Tumorselektivität von Glucuronid-Prodrugs führt zu entsprechend höheren Wirkstoffspiegeln in den Tumoren und gleichzeitig zu niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen in gesunden Geweberegionen, d.h. die Effektivitäten und Verträglichkeiten der Chemotherapeutika werden gesteigert.

Bekannte Beispiele sind Doxorubicin-Glucuronid-Prodrugs, welche im Vergleich zum freien Doxorubicin in Tumorgewebe ca. 10 fach höhere Doxorubicinspiegel ermöglichen, aber gleichzeitig gesundes Gewebe mit einer erniedrigten Konzentration schonen, so daß z.B. die typische kardiotoxische Eigenschaft von Doxorubicin nur noch eine untergeordnete Rolle spielt [Bosslet K., Cell Biophys (1994) 24-25: 51-63; Bosslet K., Cancer Res (1994) 54: 2151-9; Bosslet K., Cancer Res (1998) 58: 1195-201; Murdter, T. E., Cancer Res (1997) 57: 2440-5].

Keine dieser Untersuchungen hat bisher zu therapeutisch nutzbaren Resultaten, d. h. brauchbaren Arzneimitteln, geführt.

#### **4 Beschreibung der Erfindung**

Die Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, Glucoronidasehemmer zu finden, die ansonsten pharmakologisch nicht oder wenig wirksam sind, d. h. wenige Nebenwirkungen aufweisen, um sie als Arzneimittel in den unter 1) bis 3) geschilderten Anwendungen alleine oder in Kombination mit anderen Arzneimitteln zur Erhöhung der therapeutischen Breite einzusetzen.

Von den Erfindern wurde nun gefunden, daß die kardioaktive Substanz Verapamil und ähnliche Derivate wie Gallopamil, die als Calciumantagonisten bekannt sind, die Aktivität von beta-Glucuronidase in einem erheblichen Ausmaß hemmen (B. Sporker et al., Eur. J. Clin. Pharm. (1999), Vol. 55, A. 16). Die Hemmung erfolgt bei einer Applikation von 1 - 10 mg pro kg Körpergewicht und Tag im gleichen Ausmaß durch die racemischen Verbindungen und die reinen Enantiomere. Es ist bekannt, daß die diversen Wirkungen von Verapamil auf das Herz und das Gefäßsystem im wesentlichen vom S-Enantiomeren ausgehen [Mickisch G. H., J Cancer Res Clin Oncol (1995) 121(Suppl 3): R11-R16]. Somit kann bei Anwendung des kaum kardioaktiv wirksamen R-Enantiomeren von Verapamil bzw. Verapamil-Derivaten der erwünschte Hemmeffekt auf die beta-Glucuronidaseaktivität erzielt werden, ohne daß die für Verapamil bekannten pharmakologischen Wirkungen als unerwünschte Nebenwirkung auftreten.

Insbesondere ist die adjuvante orale Gabe retardierter Arzneimittel aus Verapamil bzw. dessen Derivaten für Anwendungen bestimmt, die den Darm vor toxischen Spaltprodukten aus Glucuroniden schützen. Im Falle der adjuvanten Gabe in der Krebstherapie ist, die dabei auch auftretende systemische Verteilung der Inhibitoren vom Verapamil-Typ kein Nachteil. Es ist bekannt, daß Verapamil die Behandlung chemotherapieresistenter Krebszellen günstig beeinflusst [Volm M., Anticancer Res 18(C4): 2905-17; Wainer I. W. Ann Oncol (1993) 4(Suppl 2): 7-13]. Dabei werden verschiedene Mechanismen der Wirkungsweise diskutiert, wobei Verapamil die aktive Ausschleusung der Chemotherapeutika aus den Krebszellen unterdrückt [Simpson W. G., Cell Calcium (1985) 6: 449-67] oder etwa die Expression von Multidrug-Resistance-Genen unterbindet [Ling V., Cancer Chemother Pharmacol (1997) 40(Suppl): S3-S8; Mickisch G. H., J Cancer Res Clin Oncol (1995) 121(Suppl 3): R11-R16].

Glucuronidasehemmer des Verapamil-Typs können auch unterstützend bei der Chemotherapie mit neuartigen Glucuronid-Prodrug-Chemotherapeutika eingesetzt werden. Die Therapieunterstützung mit Glucuronidasehemmern des Verapamil-Typs beinhaltet den Schutz des gesunden Gewebes vor den Wirkungen dieser Chemotherapeutika, insbesondere vor den Wirkungen hoher lokaler Konzentrationen an Einstichstellen oder anderen Zuführungsstellen.

Die Verapamil Gabe und Dosierung erfolgt in der Weise, daß lokal am Infusionszugang das gesunde Gewebe geschont wird, d.h. hier die Glucuronidasen inhibiert werden, aber nach der systemischen Durchmischung im Tumorgewebe keine Deaktivierung der Tumorglucuronidasen stattfindet.

Physiologisch wenig stabile Glucuronidprodrugs werden pharmazeutisch durch Zusatz eines Glucuronidaseinhibitors so stabilisiert, daß erst nach der systemischen Durchmischung im Organismus die Spaltung bevorzugt im Zielgewebe erfolgt.

Bei Gabe biologisch inaktiver Glucuronidprodrugs zusammen mit einem beta-Glucuronidaseinhibitor wird die Spaltung in das wirksame Substrat verzögert, so daß bei Prodrugs mit langer Eliminationshalbwertszeit die systemische Verfügbarkeit verlängert wird. Entsprechend kann die Dosis verringert und das Dosierungsintervall verlängert werden.

Bei der tumorspezifischen Prodrugtherapie wird durch zusätzliche Gabe eines zellmembrandurchlässigen beta-Glucuronidaseinhibitors die therapeutische Breite dadurch erhöht, daß die weitgehend intrazellulär vorliegende beta-Glucuronidase im gesunden Gewebe inhibiert und dadurch eine pharmakologische Wirkung verhindert wird. Im Tumorgewebe wird durch die physiologisch oder durch ADEPT-Therapie erhöhte Glucuronidasekonzentration das wirksame Substrat bei geeigneter Dosiswahl nach wie vor gebildet.

Die in der Erfindung beanspruchte Hemmwirkung auf die beta-Glucuronidaseaktivität wird in den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen belegt.



## **Untersuchungen zur Senkung der humanen $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität durch Verapamil, seine Metabolite und Gallopamil**

Der Calcium-Antagonist Verapamil (sowohl Racemat als auch beide Enantiomere), seine Metabolite und das Derivat Gallopamil sind in der Lage, die Aktivität der menschlichen  $\beta$ -Glucuronidase zu verringern.

Eine direkte Inhibition der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität konnte bei Experimenten mit humanen Leberhomogenaten gezeigt werden. Dazu wurden Homogenate verschiedener Leberproben mit 2.5 mM 4-Methylbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG) inkubiert und mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen des freigesetzten 4-Methylumbelliferons ist ein Maß für die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase. Bei Homogenaten, die zusätzlich zu MUG noch 100  $\mu$ M Verapamil (Racemat) erhielten, war die Aktivität signifikant um ca. 25% gegenüber der Kontrollproben verringert (Abb. 1).

Parallel bewirken Verapamil, die Metabolite Norverapamil, D702, D703 und Gallopamil in der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 nach 48 h-Inkubation eine Verringerung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität auf 50-65%, die auf eine gesenkte Expression des Enzyms zurückzuführen ist. Diese Senkung der Aktivität ist konzentrationsabhängig (Abb. 2).

Die Senkung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität konnte gleichermaßen stark mit Verapamil-Racemat und mit R- und S-Verapamil beobachtet werden. Die Metabolite Norverapamil, D702 und D703 zeigen einen vergleichbaren Einfluß auf die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in HepG2-Zellen. Die Inkubation mit D617, einem weiteren Metaboliten, bewirkt nur eine Senkung der Aktivität um 12 %, die allerdings statistisch nicht signifikant ist. Gallopamil bewirkt einen dem Verapamil vergleichbaren Effekt (Abb. 3).

### Beispiel 1

Hemmung der Aktivität humaner Leber- $\beta$ -Glucuronidase durch Verapamil (Abb. 1).

Humane Leberhomogenate wurden mit dem Enzym-Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid inkubiert (1 h, 37°C). 100  $\mu$ M Verapamil oder DMSO (Kontrolle) wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon wurde mittels HPLC-Analyse gemessen (\*signifikanter Unterschied zur Kontrolle;  $p < 0.001$ ;  $n = 3$  unabhängige Experimente).

### Beispiel 2

Konzentrationsabhängigkeit der Verapamil-Wirkung in der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 (Abb. 2).

HepG2-Zellen wurden 48 h bei 37°C mit den in Abb. 2 angegebenen Konzentrationen Verapamil inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde jeweils 2.25  $\mu$ g zelluläres Protein mit dem  $\beta$ -Glucuronidase-Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid inkubiert (2h, 37°C) und die Konzentration des freigesetzten 4-Methylumbelliferons mittels HPLC gemessen (\*signifikanter Unterschied zur Kontrolle,  $p < 0.05$ ).

### Beispiel 3

Senkung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in HepG2-Zellen durch Inkubation mit Verapamil, Verapamil-Metaboliten und Gallopamil (Abb. 3)

HepG2-Zellen wurden 48h bei 37°C mit 100  $\mu$ M Verapamil (Vera), je 100 $\mu$ M D617, D702, D703, 30 $\mu$ M Norverapamil (Nor) oder 100 $\mu$ M Gallopamil (Gallo) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität mittels 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid-Spaltung bestimmt (signifikanter Unterschied zur Kontrolle, \* $P < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ ;  $n = 3$  unabhängige Experimente).

#### Beispiel 4

Senkung der beta-Glucuronidase-Expression durch Verapamil in der humanen Hepatom Zelllinie HepG2 (Abb. 4).

HepG2 Zellen wurden 48 h bei 37°C mit 100 µM Verapamil oder DMSO (Kontrolle) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden 50 µg zelluläres Protein mittels SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper 2156/42 inkubiert. Die Bandenintensität wurde densitometrisch bestimmt (DE = densitometrische Einheiten; \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle,  $p < 0.05$ ;  $n=3$  unabhängige Experimente)

#### Hemmung der Glucuronidasen im Darm durch Verapamil

In einer Studie mit Spague-Dawley-Ratten wurde die Absorption von oral applizierten Morphin-6-Glucuronid (M6G) an zwei Gruppen (Gruppe 1:  $n=5$ , ohne Verapamilgabe; Gruppe 2:  $n=4$  vorherige Verapamilgabe) untersucht. Die Studie wurde mit Ratten durchgeführt, da diese aus Morphin metabolisch kein M6G bilden [Aasmundstad T.A., Biochem Pharmacol (1993) 46: 961-968], so daß das im Plasma gemessene M6G ausschließlich aus der Absorption des oral gegebenen M6G entstammt.

Während die vorherige Gabe von Verapamil keinen Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentrationen von M6G oder deren Zeitverlauf hatte, waren die Konzentrationen von Morphin und M3G bei vorheriger Verapamil-Gabe (Gruppe 2) deutlich kleiner als bei der Gruppe ohne Verapamil (Gruppe 1) (Abb. 5).

Der fehlende Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentration von M6G oder deren Zeitverlauf macht unwahrscheinlich, daß die Verminderung der Morphin- und M3G-Absorption auf einer Hemmung der intestinalen Motilität [Shah M. H., J. Pharm Pharmacol (1987) 39:1037-1038; Krevsky B., Dig Dis Sci (1992) 37:919-924] beruhen. Es ist bekannt, daß M6G die intestinale Motilität mit gleicher Potenz hemmt wie Morphin [Schmidt N., Eur J Pharmacol (1994) 255: 245-237]. Eine Steigerung dieser Hemmung durch Verapamil [Shah M. H., J Pharm Pharmacol

(1987) 39: 1037-1038] wirkt sich mit aller Wahrscheinlichkeit auf M6G und Morphin gleichermaßen aus. Dagegen wurden nur die Plasmaspiegel von Morphin bzw. M3G, nicht aber von M6G vermindert, d.h. die Spaltung des nach oraler Applikation intestinal verfügbaren M6G zu Morphin wird somit gehemmt. Daraus resultieren geringere Morphin- und in der Folge M3G-Plasmaspiegel, da der größte Teil des absorbierten Morphins durch Glucuronyl-Transferasen zu M3G metabolisiert wird. Die Versuchsdurchführung wird in Beispiel 5 beschrieben.

#### Beispiel 5

Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von Morphin-6-Glucuronid (M6G), Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) nach oraler Applikation an Sprague-Dawley-Ratten von M6G, mit oder ohne vorherige orale Applikation von Verapamil (Abb. 5).

Die Untersuchung wurde an 9 männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Ratten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (5 Tiere, Gewicht:  $258.6 \pm 31.2$  g) erhielt nur 62.5 mg/kg Morphin-6-Glucuronid (M6G) peroral verabreicht. Gruppe 2 (4 Tiere, Gewicht  $272 \pm 8$ g) bekam 15 Minuten vor M6G-Gabe (62.5 mg/kg peroral) 70 mg/kg Verapamil peroral verabreicht. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihres Gewichtes nicht signifikant voneinander (t-Test:  $t = -0.923$ ,  $p = 0.401$ ; Konfidenzintervall für Differenzen Gruppe 1 – Gruppe 2: -51.6 bis 24.8 g).

M6G und Verapamil wurden in Ringer-Laktat gelöst und anschließend mit Tylose-Schleim gemischt. Jeder Ratte wurden 62.5 mg M6G pro kg Körpergewicht in Tylose-Schleim oral verabreicht. 4 Ratten erhielten 15 min vor der Verabreichung von M6G 70mg Verapamil pro kg Körpergewicht in Tylose-Schleim oral verabreicht.

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von M6G, Morphin und M3G wurden bei jeder Ratte 6 Blutproben (je ca. 200 µl) zu folgenden Zeiten entnommen: vor der Applikation von M6G, sowie 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach M6G-Gabe. Die Blutproben wurden in heparinisierte EDTA Kunststoffröhrchen überführt und sofort

zentrifugiert. Die bereiteten Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentration von M6G, Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) wurden mittels HPLC bestimmt (vgl. Hartley R., Biomed Chromatogr (1993) 7: 34-37). Die Nachweisgrenze lag für alle drei Substanzen bei 10 ng/ml, d.h. 35.05 nmol/l für Morphin und 22.45 nmol/l für die Morphinglucuronide. Der Variationskoeffizient lag im gesamten Kalibrationsbereich (10-500 ng/ml) unter 11%.

### **Hemmung mikrobieller beta-Glucuronidase durch Verapamil**

Aus Beispiel 5 ist ersichtlich, daß eine Spaltung von Glucuroniden (M6G) im Darm der Ratte erfolgt. Es ist nicht ersichtlich, ob beta-Glucuronidasen der Ratte und/oder mikrobielle beta-Glucuronidasen (z.B. *E. coli*) für diese Spaltung verantwortlich sind.

Um diese Frage zu klären, wurden beta-Glucuronidasen aus Ratten-Darm-Homogenaten und aus *E. coli* mit Verapamil oder D-Glucarsäure-1,4-lacton in Gegenwart von 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG) inkubiert. Die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid ist ein Maß für die Aktivität der beta-Glucuronidase. Wie zu erwarten hemmt D-Glucarsäure-1,4-lacton sowohl die beta-Glucuronidase-Aktivität der Ratten-Darm-Homogenate als auch die *E. coli*-beta-Glucuronidase (Abb. 6 A und B). Überraschender Weise wird das bakterielle Enzym von Verapamil deutlich gehemmt ( $\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$ ), hingegen wird die Ratten-beta-Glucuronidase von Verapamil nicht meßbar beeinflusst (Abb. 6 A und B).

Die Versuchsdurchführung wird in Beispiel 6 beschrieben.

#### **Beispiel 6**

Hemmung der 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG) Spaltung durch Verapamil und D-Glucarsäure-1,4-lacton (Abb. 6).

Tiefgefrorenes Gewebepulver einer Ratten-Mucosa (duodenum und jejunum) wurde in 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1mM pefabloc® (Fa. Roth,

Karlsruhe, Germany) suspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry bestimmt [Lowry O. H., J Biol Chem (1951) 193:265-275]. Die Inkubation und Analyse erfolgte nach: [Sperker B, J Pharmacol Exp Ther (1997) 281: 914-920]. 50 µl Inkubationsmischung enthielten 2.25 µg Ratten-Protein-Homogenat oder 110 pg (0.001 units) gereinigter *E. coli*-beta-Glucuronidase (Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany). Die Testpuffer enthielten 0.2 mM MUG (Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany).

Die Inkubationsmischungen wurden bei 37°C mit Verapamil oder D-Glucarsäure-1,4-lacton versetzt. Nach 10 Minuten wurden die MUG Puffer zugesetzt. Nach 1 Stunde bei 37°C wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von 150 µl 200 mM Natriumcarbonat-Lösung gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 U/min) wurden die Überstände mittels HPLC (Fluoreszenz: Absorption 355 nm, Emission 460 nm) analysiert. Die Enzymaktivität wurde mit der Freisetzung von 4-Methylumbelliferone (MU) korreliert. Die Versuche wurden bei den entsprechenden pH-Optima der beta-Glucuronidasen (pH 7.0 *E. coli* bzw. pH 5.0 Ratte) durchgeführt.

Abb. 1 Hemmung der Aktivität humaner Leber- $\beta$ -Glucuronidase durch Verapamil

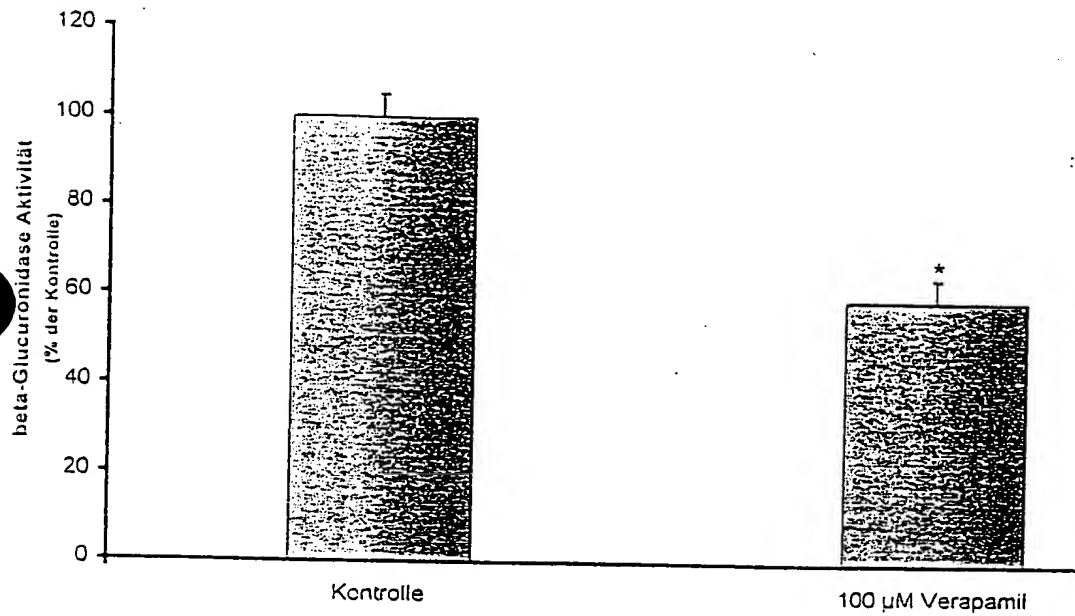


Abb. 2 Konzentrationsabhängigkeit der Verapamil-Wirkung in der humanen HepG2-Zelllinie

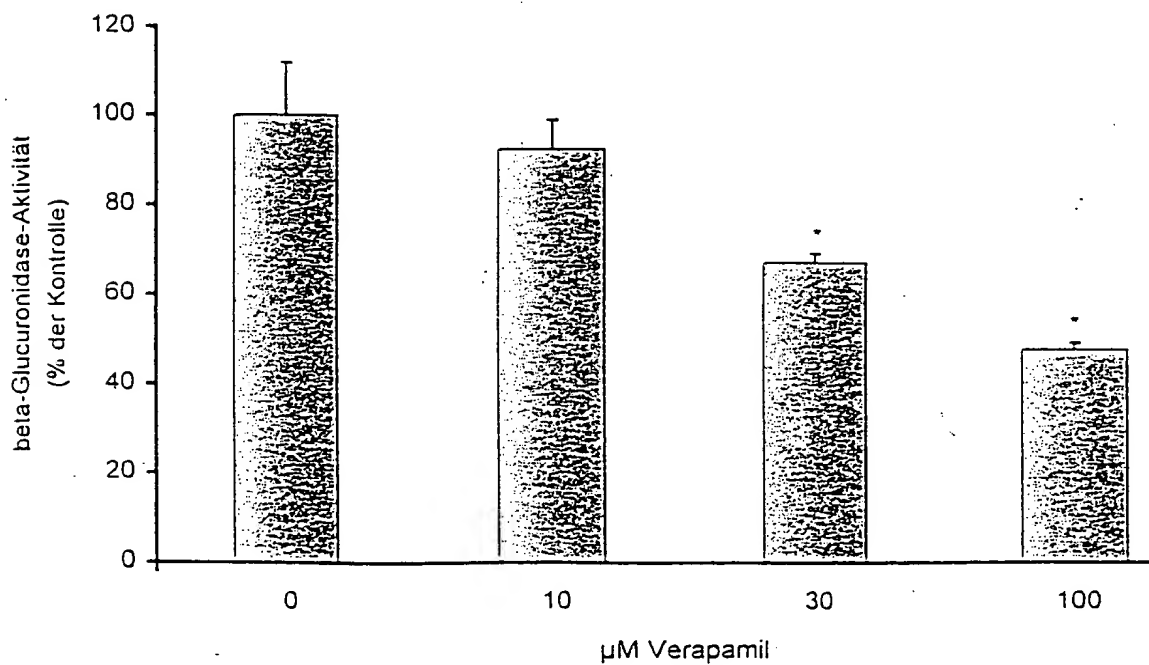


Abb. 3 Senkung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in HepG2-Zellen durch Inkubation mit Verapamil, Verapamil-Metaboliten und Gallopamil

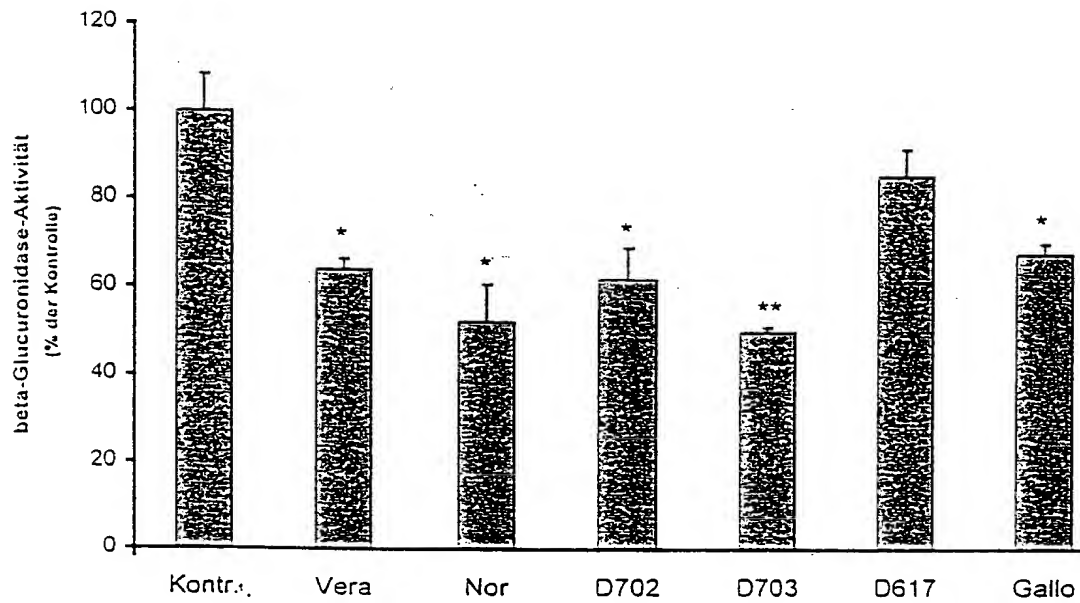


Abb. 4 Senkung der beta-Glucuronidase-Expression durch Verapamil in der humanen Hepatom Zelllinie HepG2.

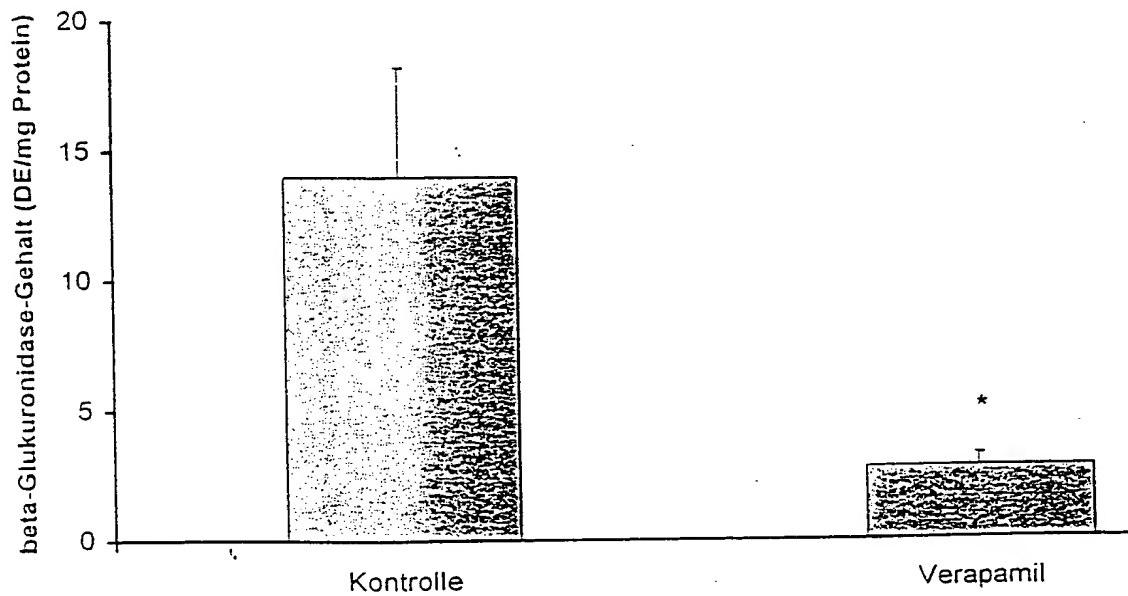




Abb. 5 Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe (Median und Quartilen 1 und 3) von Morphin-6-Glucuronid (M6G), Morphin und Morphin-3-Glucuronid (M3G) nach oraler Applikation von M6G, mit oder ohne vorherige orale Applikation von Verapamil

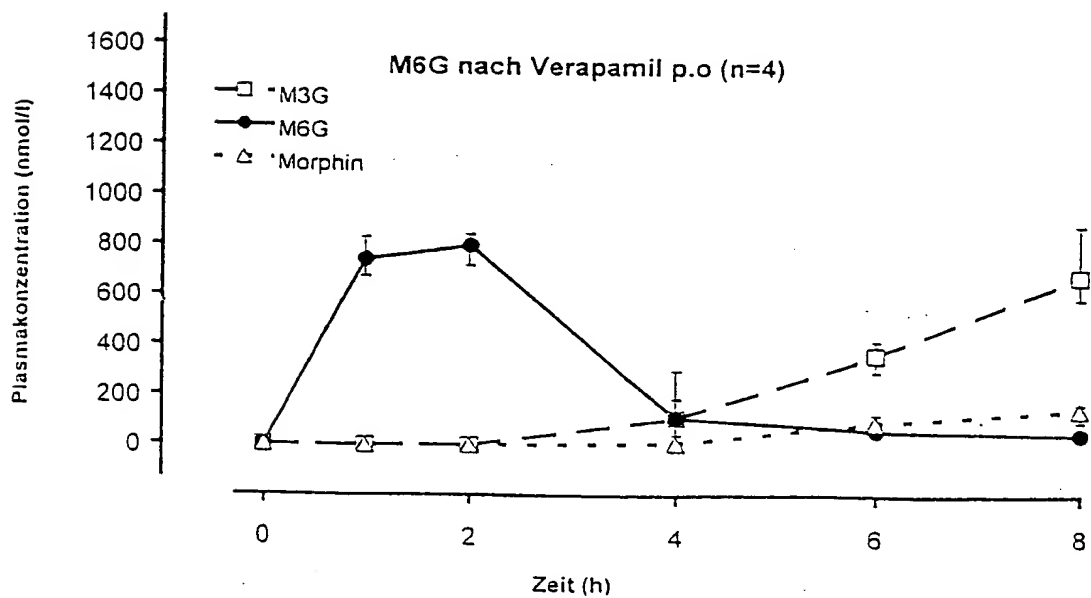
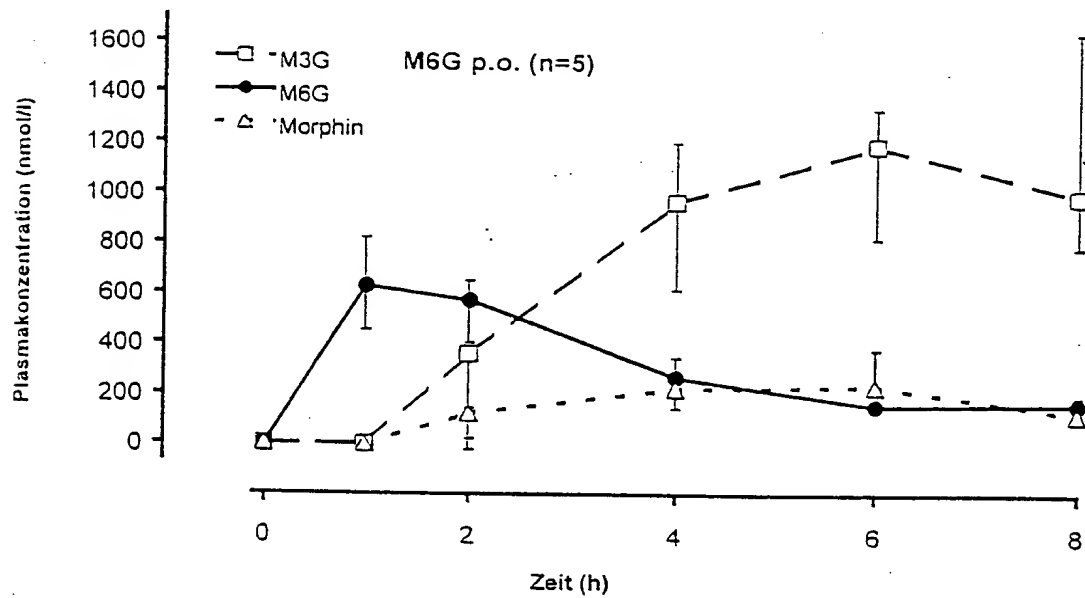
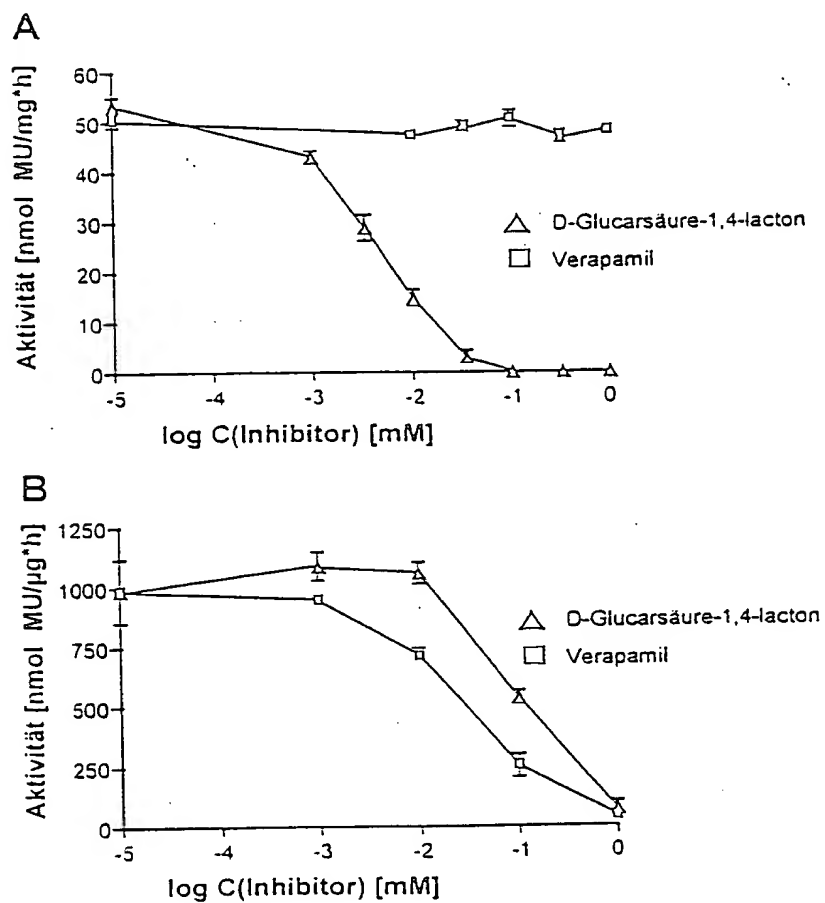


Abb. 6 Hemmung der 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid Spaltung durch Verapamil und D-Glucarsäure-1,4-lacton (A Ratte, B E. coli)



### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Verapamil oder Verapamilderivaten zur Herstellung von Arzneimitteln mit Glucuronidase hemmender Wirkung.